

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



|  |   |   |
|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><b>C12Q 1/68, 1/44, C12N 9/00</b>   | <b>A1</b>   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/47704</b><br><br>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. September 1999 (23.09.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01776<br>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. März 1999 (17.03.99)<br><br>(30) Prioritätsdaten:<br>198 11 618.7        17. März 1998 (17.03.98)        DE<br><br>(71)(72) Anmelder und Erfinder: JENNE, Andreas [DE/DE];<br>Angerweg 12, D-83253 Rimsting (DE). FAMULOK,<br>Michael [DE/DE]; Schmaedelstrasse 28, D-81245 München<br>(DE).<br><br>(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675<br>München (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: IL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>         Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |   |

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING DNA CODING FOR A RIBOZYME AND AN OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATE, AND METHOD FOR MEASURING TRANSCRIPTION RATES

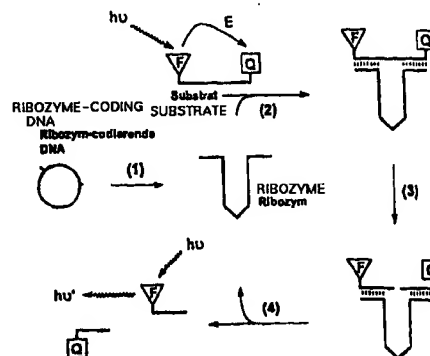
(54) Bezeichnung: RIBOZYM CODIERENDE DNA UND EIN OLIGONUCLEOTIDSUBSTRAT ENTHALTENDE ZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZUR MESSUNG VON TRANSKRIPTIONSRATEN

**(57) Abstract**

The invention relates to compositions (reporter systems) containing a DNA sequence coding for a ribozyme as well as an oligonucleotide substrate, which is split by the ribozyme transcribed by the DNA sequence. According to a preferred version of the invention the oligonucleotide substrate is marked with a fluorophoric group (reporter group) and a fluorescence-quenching group (quencher group). After splitting by the ribozyme, quenching of the fluorescence of the fluorophore by the fluorescence-quenching group is suppressed, so that a fluorescence signal is generated. The invention also relates to methods for measuring transcription rates, for example to determine transcription inhibitors or transcription activators.

**(57) Zusammenfassung**

Beschrieben werden Zusammensetzungen (Reportersysteme), die eine ein Ribozym codierende DNA-Sequenz enthalten und ein Oligonucleotidsubstrat, das von dem von der DNA-Sequenz transkribierten Ribozym gespalten wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Oligonucleotidsubstrat mit einer fluorophoren Gruppe (Reportergruppe) und einer fluoreszenzlöschenden Gruppe (Quenchergruppe) markiert, wobei nach Spaltung mit dem Ribozym die Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors durch die Fluoreszenz-löschenden Gruppen unterbunden ist, also ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Ferner werden Verfahren zur Messung von Transkriptionsraten beschrieben, beispielsweise zur Bestimmung von Hemmstoffen der Transkription oder Transkriptionsaktivatoren.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali  | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi  | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen   |    |                                |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |
| EE | Estland                      |    |                                   |    |   |    |                                |

**Ribozym codierende DNA und ein Oligonucleotidsubstrat ent-  
haltende Zusammensetzung und Verfahren zur Messung von  
Transkriptionsraten**

Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen (Reportersysteme), die eine ein Ribozym, bevorzugt ein Hammerheadribozym, codierende DNA-Sequenz enthalten und ein Oligonucleotidsubstrat, das von dem von der DNA-Sequenz transkribierten Ribozym gespalten wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein FRET-Oligonucleotid verwendet, d.h. ein Oligonucleotidsubstrat, das mit einer fluorophoren Gruppe (Reportergruppe) und einer fluoreszenzlöschenden Gruppe (Quenchergruppe) markiert ist, wobei nach Spaltung mit dem Ribozym die Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors durch die fluoreszenzlöschende Gruppe unterbunden ist, also ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Messung von Transkriptionsraten, beispielsweise zur Bestimmung von Hemmstoffen der Transkription oder Transkriptionsaktivatoren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, und Verfahren zur Messung der katalytischen Aktivität von Ribozymen.

Die Mechanismen eukaryontischer und prokaryontischer Transkription werden in der Regel mit Verfahren untersucht, bei denen die mRNA zellfrei, d. h. unter Verwendung entsprechend aufbereiteter Zellextrakte, in vitro synthetisiert wird ("In vitro-Transkription"). Für die Herstellung von Transkripten werden dabei speziell entwickelte Transkriptionsvektoren eingesetzt, die zusätzlich zum Reportergen auch den Promotor für eine entsprechende RNA-

Polymerase tragen. Soll beispielsweise der Einfluß bestimmter Transkriptionsaktivatoren auf die Transkription untersucht werden, so muß die mRNA des codierenden Reportergens mit geeigneten Methoden nachweisbar und quantifizierbar sein. Im allgemeinen werden dem Zellextrakt dazu radioaktiv markierte Nucleosidtriphosphate beigelegt, welche in die entstehende mRNA eingebaut werden. Die radioaktiv markierte mRNA wird dann aus dem Zellextrakt isoliert, auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert und quantifiziert (T. Maniatis, E. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982), 6.45). Ein alternatives Verfahren, die sog. "Dot-Hybridisations-Technik", nutzt radioaktiv markierte RNA-Sonden zum Nachweis der in vitro transkribierten mRNAs (J. Flores et al., Lancet 1 (1983), 555-558). Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit, die Transkription indirekt über die Aktivität des Luciferase-Enzyms zu detektieren, indem die Transkription des Luciferase-Reporter-Gens an ein in vitro Translationssystem gekoppelt ist. Die Nachteile der vorstehend beschriebenen und teils routinemäßig verwendeten Nachweismethoden sind insbesondere der Einsatz von größeren Mengen radioaktiv markierter Nucleosidtriphosphate und/oder der hohe methodische und zeitliche Aufwand, der mit der Quantifizierung der RNA-Transkripte verbunden ist. Bessere Methoden zur direkten, schnellen und sensitiven Messung von Transkriptionsraten sind jedoch nicht nur für wissenschaftliche Fragestellungen von Interesse, sondern auch für die biotechnologisch arbeitende Industrie. So werden beispielsweise beim sog. "High throughput screening" kombinatorische Substanzbibliotheken auf potentielle Leitstrukturen durchsucht, welche die Transkription bestimmter therapeutisch relevanter Zielgene beeinflussen. Auch für solche und ähnliche Anwendungen würde ein technisch einfaches, sensitives Nachweis-System einen

großen Fortschritt bedeuten, da hier bislang keine befriedigenden Lösungen existieren.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Verfahren und für diese Verfahren geeignete Systeme bereitzustellen, die eine einfache und empfindliche Messung von Transkriptionsraten erlauben.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung (Reportersystem), die genannten Probleme umgangen werden können. Dieses System weist unter anderem die folgenden Vorteile auf:

- Direkter Nachweis der mRNA im Zellextrakt.
- Schnelle, reproduzierbare und technisch einfache Quantifizierung von Transkriptionsraten, beispielsweise über automatisierte Fluoreszenz-Messung.
- Hochsensitiver und hochspezifischer Nachweis auch kleinster Mengen an RNA-Transkripten (katalytisches Prinzip zur Signalverstärkung).
- Einfache Verlaufskontrolle der Transkription, beispielsweise durch zeitabhängige Fluoreszenzmessung (Echtzeit-Analytik).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine Zusammensetzung, enthaltend

- (a) eine ein Ribozym codierende DNA-Sequenz, die mit einem Promotor und/oder regulatorischen Elementen funktionell verknüpft ist; und

- (b) ein Oligonucleotidsubstrat, das von dem von der DNA aus  
(a) transkribierten Ribozym gespalten wird,

wobei nach Spaltung ein unmittelbar meßbares Signal erzeugt wird, da das gespaltene Oligonucleotidsubstrat von dem ungespaltenen Oligonucleotidsubstrat unterscheidbar ist.

Der hier verwendete Ausdruck "Ribozyme" betrifft katalytische RNA-Moleküle mit der Fähigkeit, andere RNA-Moleküle an Phosphodiester-Bindungen sequenzspezifisch zu spalten. Die Hydrolyse der zu spaltenden Zielsequenz wird dabei stets eingeleitet durch Ausbildung eines katalytisch aktiven Komplexes, bestehend aus Ribozym und Substrat-RNA. Nach erfolgter Spaltung dissoziiert das hydrolysierte Substrat-Oligonucleotid vom Ribozym ab; letzteres ist dann für weitere Umsetzungen verfügbar.

Für die erfindungsgemäßen Zwecke eignen sich prinzipiell alle Ribozyme, die Phosphodiester-Bindungen in trans, d.h. intermolekular spalten können. Abgesehen von Ribonuclease P (C. Guerrier-Takada et al., Cell 44 (1983) 849-857) sind die bekannten natürlicherweise vorkommenden Ribozyme (Hammerhead-Ribozym, Hairpin-Ribozym, Hepatitis Delta Virus Ribozym, Neurospora mitochondriales VS Ribozym, Gruppe I und Gruppe II Introns) allerdings sich selbst spaltende bzw. selbst spleißende Katalysatoren, die in cis (intramolekular) wirken (Übersichtsartikel in P. Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997), 1-9). Durch Separieren der katalytischen Einheit von der die Spaltstelle enthaltenden Sequenz, gelang es in allen Fällen, in trans spaltende Ribozym-Varianten herzustellen: Hammerhead-Ribozym (J. Haselhoff und W. Gerlach. Nature 334 (1988), 585-591); Hairpin-Ribozym (A. Hampel und R. Tritz, Biochemistry 28 (1989), 4929-4933); Hepatitis Delta Ribozym (M. Been, Trends Biochem. Sci. 19 (1994) 251-256);

Neurospora mitochondriales VS Ribozym (H. Guo et al., J. Mol. Biol. 232 (1993) 351-361); Gruppe I Intron aus Tetrahymena (Zaug et al., Nature 324 (1986), 429-433); Gruppe II Intron (S. Augustin et al., Nature 34 (1990) 383-386).

Der hier verwendete Ausdruck "Promotor" betrifft jede DNA-Sequenz, die die Transkription der damit funktionell verknüpften DNA-Sequenz durch die entsprechende RNA-Polymerase in vivo (oder in vitro) in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen steuert. Solche Promotoren sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise PolIII-Promotoren, SP6-, T3- und T7-Promotoren. Die endogene Ribozym-Expression in eukaryontischen Zellen bzw. Zellextrakten kann beispielsweise durchgeführt werden, indem die Ribozym-codierende DNA-Sequenz in die untranslatierte Region von Genen inseriert wird, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden und unter der Kontrolle von stark transkribierenden Promotoren stehen. Beispiele sind virale Promotoren, wie der SV40 frühe Promotor (F. Cameron und P. Jennings, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 9139-9143), der Promotor des Actin-Gens (N. Sarver et al. Science 247 (1990) 1222-1225) oder ein retroviraler "long terminal repeat", wie der HIV-LTA (Koizumi et al., Gene 117 (1992), 179-184).

In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei dem Ribozym um ein Hammerhead-Ribozym. Das Hammerhead-Ribozym ist mit nur etwa 30 Nucleotiden Länge eines der kleinsten bekannten Ribozyme, das die ortsspezifische Hydrolyse von Phosphodiester-Bindungen katalysiert (Übersichtsartikel: K. Birikh et al., Eur. J. Biochem. 245 (1997) 1-16). Die Ribozym-Struktur umfaßt drei doppelsträngige Bereiche (Helices I, II und III), welche die spaltbare Phosphodiester-Bindung flankieren, sowie zwei hochkonservierte einzelsträngige Sequenzen (O. Uhlenbeck, Nature 328 (1987), 596-600). Durch Separieren der katalytischen Core-Sequenz von

einer die Spaltstelle enthaltenden Substrat-Sequenz gelang es, Ribozym-Varianten herzustellen, die in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen nahezu jede Ziel-RNA in trans zu spalten (J. Haselhoff und W. Gerlach, Nature 334 (1988), 585-591).

Im Zusammenhang mit den vielversprechenden therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von Hammerhead-Ribozymen gelang es in jüngster Zeit, Hammerhead-Ribozyme hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften (hohe Umsatzraten), der Sequenzlänge (Minimalmotive) sowie Substrat-Spezifitäten zu optimieren. Übersichtsartikel zu diesem Thema sind z.B. Birikh, Eur. J. Biochem. 245 (1997), 1-16; Burke, Nature Biotech. 15 (1997), 414-415 und Eckstein, Lilley (Hrsg.), Nucleic Acids and Molecular Biology 10, Springer Verlag (1996), 173-329.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die vorstehenden Promotoren regulierbar, d.h. sie können, beispielsweise durch Transkriptionsaktivatoren, aktiviert werden oder durch bestimmte Verbindungen gehemmt werden. Gene von Eukaryonten und Prokaryonten unterscheiden sich hinsichtlich der Organisation der Transkriptionseinheit beträchtlich voneinander (H. Ibelgaufts, Gentechnologie von A bis Z, VCH Verlag Weinheim (1990), 219-223). Der 5'-flankierende Bereich eines eukaryontischen Gens wird häufig als Promotorregion bezeichnet, da er eine Reihe von distinkten DNA-Sequenzelementen enthält, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sind. Hierzu zählen u. a. die TATA-Box und die Initiatorsequenz, die zusammen den Core-Promotor bilden. Die basale Transkription wird im wesentlichen durch die grundsätzlichen Transkriptionsaktivatoren der Klasse II reguliert (TF II A, B, D, E, F, H und Pol II). Analog zur basalen Transkription spricht man von einer aktivierten Transkription, wenn zusätzliche regulatorische Elemente die Transkription beeinflussen. Eine Aktivierung erfolgt



vornehmlich durch Bindung von Transkriptionsaktivatoren an sog. "Upstream activating sequences" (UAS). Beispiele für eine aktivierte Transkription sind: SP1 bindet an die SP1-Bindestelle, CREB bindet an das CRE-Element.

Durch Auswahl geeigneter Promotoren können, wie nachstehend noch näher beschrieben, in einem geeigneten Testsystem, Verbindungen, die die Transkription aktivieren oder hemmen, identifiziert werden. Die Wahl des Promotors hängt von der Art des in vitro-Transkriptions-Systems (z.B. Hefe-, HeLa- oder Pilz-Zellextrakte) und der verwendeten RNA-Polymerase ab. Mit dem hier beschriebenen Verfahren kann gemessen werden, ob die Transkription generell inhibiert oder aktiviert wird, bzw. unbeeinflusst bleibt. Der Mechanismus oder das Prinzip der Beeinflussung durch eine bestimmte Substanz einer Verbindungsbibliothek ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

Vorzugsweise ist die das Ribozym codierende DNA-Sequenz ein linearisierter Vektor, in dem die Termination der Transkription durch Spaltung der Matrizen-DNA stromabwärts der das Ribozym codierenden DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym erfolgen kann. Alternativ ist die das Ribozym codierende DNA-Sequenz mit einem Terminationssignal für die Transkription bei in vivo-Anwendungen funktionell verknüpft. Solche Terminationssignale sind dem Fachmann bekannt. Ein allgemeines prokaryontisches Stop-Signal der Transkription ist ein GC-reicher Bereich bestimmter Symmetrie, auf den eine AT-reiche Sequenz folgt (A. Wu und T. Platt, Proc. Natl. Acad. Sci. 75 (1978), 5442-5446). Auch für die eukaryontische Pol II gibt es Stop-Signale, die die Termination der Transkription an einer definierten Stelle erlauben.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die das Ribozym codierende DNA, gegebenenfalls mit den weiteren, vorstehend diskutierten Sequenzen in einen Vektor insertiert, der die Vermehrung der insertierten DNA in einem geeigneten Wirt erlaubt. Geeignete Vektoren für die Vermehrung in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen sind dabei z.B. pBR322, pNEB193, pUC18, pUC19 (Biolabs, USA.) (J. Sampson und O. Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 1033-1037).

Die vorstehend beschriebenen Ribozyme (bevorzugt Hammerhead-Ribozyme oder Hammerhead-Ribozym-Varianten) können als direkte Reporter zur Quantifizierung von Transkriptionsraten in in vitro-Transkriptions-Systemen eingesetzt werden. Die Reporter-RNA wird dabei endogen erzeugt, d. h. durch Abschrift des codierenden Gens, beispielsweise von einem geeigneten Transkriptionsvektor.

Bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen stabilisierte Ribozyme, was eine längere Lebensdauer des Ribozyms, z.B. in in vitro-Transkriptionssystemen gewährleistet. Dabei wird das Ribozym zusammen mit stabilisierenden Sequenzen transkribiert, die sogenannte "Capping-Strukturen" imitieren und dadurch die Stabilität der RNA gegenüber Exonuclease-Degradation erhöhen (Gene Therapy 4 (1996), 45-54; M. Sioud et al., J. Mol. Biol. 223 (1992), 831-835).

Der hier verwendete Ausdruck "Oligonucleotidsubstrat" betrifft jedes Oligonucleotid, vorzugsweise RNA, das von dem Ribozym gespalten werden kann, wobei das gespaltene Oligonucleotidsubstrat von dem ungespaltenen Oligonucleotidsubstrat unterscheidbar ist und ein unmittelbar meßbares Signal erzeugt wird.

Beispielsweise trägt das Substrat an einem Ende eine Ankergruppe, die seine Immobilisierung an eine geeignete Matrix erlaubt und an seinem anderen Ende eine Reportergruppe, die zum Nachweis des immobilisierten (ungespaltenen) Substrates dient. Bei Abwesenheit des Ribozyms bleibt das Substrat intakt und kann nach seiner Immobilisierung auf der Matrix einfach nachgewiesen werden, da die Ankergruppe mit der Reportergruppe nach wie vor verbunden ist. Bei Anwesenheit des Ribozyms hingegen ist das Reporter-spezifische Signal nicht nachweisbar, da die Reportergruppe von der Ankergruppe infolge der Spaltung des Substrates getrennt wurde. Alternativ zur Ankergruppe (z.B. Biotin) kann die Immobilisierung des Substrats auch über komplementäre Sequenzhybridisierung erfolgen, sofern Spaltstelle und Reportergruppe jenseits der Hybridisierungsstelle liegen. Einfach nachweisbare Reportergruppen, die leicht an Nucleinsäure-Enden zu koppeln sind, sind beispielsweise  $^{32}\text{P}$ , Farbstoff-Moleküle und Moleküle, die mit markierten Antikörpern nachweisbar sind.

Das erfindungsgemäße Oligonucleotidsubstrat ist zu der(n) Sequenz(en) des Ribozyms, die für die Substratbindung verantwortlich ist (sind), im wesentlichen komplementär, d.h. es weist eine Komplementarität auf, die eine Anlagerung an das Ribozym auf eine Art und Weise erlaubt, daß eine wirksame und spezifische Spaltung des Oligonucleotidsubstrats gewährleistet ist. Vorzugsweise ist das Oligonucleotidsubstrat zu den für die Substratbindung verantwortlichen Sequenzen des Ribozyms vollständig komplementär. Die Länge des sich an das Ribozym anlagernden Bereichs des Oligonucleotidsubstrats beträgt vorzugsweise 5 bis 8 Nucleotide (P. Turner Hrsg., Ribozyme protocols, Humana press (1997), 151-159, 253-264). Das Oligonucleotidsubstrat kann an seinem 5'- und/oder 3'-Ende zusätzliche Sequenzen enthalten, die nicht an der Anlagerung an das Ribozym beteiligt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das vorstehende Oligonucleotidsubstrat doppelt markiert, wobei das gespaltene Substrat leicht vom intakten Substrat unterscheidbar ist.

Zum Beispiel enthält der in vitro-Transkriptionsansatz neben der Ribozym-codierenden DNA ein endständig biotinyliertes Substrat-Oligonucleotid, das an seinem anderen Ende mit Fluorescein markiert ist. Nach der minimalen Inkubationszeit, die bei ungehinderter Transkription zur Spaltung des Substrates ausreicht, wird die Transkription gestoppt. Der Transkriptionsansatz wird anschließend mit einer Streptavidin-beschichteten Festphase (z.B. mit einer kommerziell erhältlichen Mikrotiterplatte) inkubiert, um die Kopplung des biotinylierten Substrat-Endes an die Streptavidin-Matrix zu ermöglichen. Nach Entfernung des Transkriptionsansatzes und Waschen der Matrix wird diese vermessen. Bei ungestörter (d.h. nicht-inhibierter) Transkription ist keine Fluorescein-spezifische Fluoreszenz bzw. nur eine schwache unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz meßbar, da das Fluorescein-markierte Spaltstück nicht immobilisiert werden konnte. Erfolgte dagegen keine oder nur verminderte Transkription des Ribozyms, beispielsweise infolge von Inhibition durch einen Transkriptionsinhibitor, kann der Anteil an ungespaltenem, immobilisiertem Substrat durch Messung der Fluorescein-spezifischen Fluoreszenz quantifiziert werden.

Ein Verfahren zur zeitaufgelösten kinetischen Analyse von Ribozymen im Stundenbereich wird durch den Einsatz von FRET-Oligonucleotiden (K.J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, PCR Meth. Appln. (1995), 4, 357-362) (FRET = Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescent Spectroscopy; Plenum Press, New York (1983)) ermöglicht.

Als FRET-Substrat besonders bevorzugt sind RNA-Oligonucleotide oder DNA-RNA-Hybride in denen eine fluorophore Gruppe (z.B. FAM = 6-Carboxy-Fluorescein, TET = Tetrachloro-6-Carboxy-Fluorescein oder HEX = Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein) und eine entsprechende fluoreszenzlöschende Gruppe, ein sog. "Quencher" (z.B. Sulforhodamin 101 oder TAMRA = 6-Carboxy-TetramethylRhodamin), in räumlicher Nähe so angebracht sind, daß es zur effektiven Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors kommt (Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York (1983), 303-339; V. Förster, Annals of Physics (Leipzig) 2 (1948), 55-75). Nach Spaltung des Substrates durch Ribozym-katalysierte Hydrolyse einer bestimmten Phosphodiester-Bindung können sich die Spaltstücke in Lösung voneinander entfernen: Die Fluoreszenz des Fluorophors wird nun nicht mehr intramolekular gelöscht. Erfolgt also die Transkription des Reporter-Ribozyms in Gegenwart solcher doppelt markierten Substrate, so kann die Transkriptionsrate über die Menge an Ribozym (= mRNA des Reportergens) quantifiziert werden, da mit Spaltung des Substrates ein messbares Fluoreszenz-Signal erzeugt wird. Unter geeigneten Bedingungen (z.B. Substratüberschuß) ist die ungelöschte Fluoreszenz der Menge an transkribiertem Reporter-Ribozym sowie der Inkubationszeit proportional und kann über geeignete automatisierte "Read-Out"-Geräte quantifiziert werden.

Da der Anstieg der Fluoreszenz direkt mit der Spaltungsrate korreliert, eignet sich das System zur sensitiven, nicht-radioaktiven und schnellen Analyse von Ribozymaktivitäten. Auf der Basis eines bekannten HHR/Substrat-Komplexes (M. Fedor, O. C. Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990), 87, 1668-1672) wurde ein FRET-Substrat (SL1) konstruiert und zur zeitabhängigen Messung der Ribozymaktivität (HHR1) eingesetzt. Als Referenz und Negativkontrolle wurde eine inaktive HHR-Mutante (HHR1mut) mit identischen Substratbindestellen

verwendet. Durch Messung des spaltungsbedingten Fluoreszenzanstiegs bei verschiedenen Substratkonzentrationen können die Michaelis-Menten-Parameter des HHR in einem einzigen Experiment erhalten werden. Figur 2b zeigt die Eadie-Hofstee-Auftragung zur Bestimmung der  $k_{cat}/K_M$ -Werte als Ergebnis dieser Messung.

Um den Einfluß der FAM/TAMRA-Markierung auf die Spaltungseffizienz zu ermitteln, wurden die kinetischen Parameter in konventioneller Methode mit einem  $^{32}\text{P}$ -markierten Substrat ohne FRET-Markierung (S1) bestimmt (Figur 2a). Das konventionelle Verfahren beinhaltet die Auftrennung der Spaltprodukte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die anschließende Auswertung der Gele durch Autoradiographie (P. Hendry, M. J. McCall, T. J. Lockett, Characterizing Ribozyme cleavage reactions; P. C. Turner (Hrsg.); Humana Press: Totowa, NJ (1997), Vol. 74, 221-229).

Es zeigte sich, daß für beide Substrate (S1, SL1) sowohl die  $k_{cat}$ - als auch die  $K_M$ -Werte in der gleichen Größenordnung lagen, was beweist, daß das FRET-Substrat für die Zielsetzung sehr gut geeignet ist.

Um zu testen, ob sich das Verfahren zur schnellen Charakterisierung von Ribozymen eignet, wurden in parallelen Ansätzen Aktivitätsmessungen unter Veränderung verschiedener physikochemischer Parameter durchgeführt.

Figur 3a zeigt den zeitabhängigen Verlauf der Spaltung als Ergebnis einer typischen Messung. In Figur 3b-d ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert, der Temperatur und der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration gezeigt. Unter den hier gewählten Bedingungen wurde ein pH-Optimum bei einem Wert von 8 bestimmt, das Optimum der  $[\text{Mg}^{2+}]$  wurde bei 8 mM erreicht. Das mit 32 °C relativ niedrige Temperatur-Optimum reflektiert wahrscheinlich die vergleichsweise schwache Bindung des

Substrats an das Ribozym. Diese könnte auf die kurzen, nur fünf G-C Basenpaare enthaltenden Hybridisierungsbereiche bei gleichzeitig relativ geringer  $Mg^{2+}$ -Konzentration (4.0 mM) zurückzuführen sein.

Um apparative Meßungenauigkeiten oder unspezifische Fluoreszenzeffekte (z.B. Fluktuation des Signals durch Temperaturschwankungen) zu eliminieren, wurden die erhaltenen Datenpunkte um die Ribozym-unabhängigen Referenzwerte korrigiert, die man mit der inaktiven Muntante HHR1mut erhalten hatte. Darüber hinaus ermöglichte das Korrekturverfahren auch die Aktivitätsbestimmung von in situ erzeugten Ribozymen in Gegenwart von Zellkernextrakten.

Figur 4 zeigt das Ergebnis der Messungen einer T7 RNA Polymerase-abhängigen Transkription von Ribozym-codierenden DNA-Matrizen in Gegenwart von HeLa-Zellkernextrakten. Zur Kontrolle wurde die Messung zum einen in Abwesenheit der T7 RNA-Polymerase, zum anderen mit der inaktiven HHR-Mutante parallel durchgeführt. Beide Kurven zeigen einen leichten Anstieg der Fluoreszenz, der wohl auf unspezifische Spaltung des Substrats durch Nucleasen im Zellextrakt zurückzuführen ist. Eine weitere Kurve beschreibt die absolute Fluoreszenz, die bei der Messung unter Erzeugung von HHR1 in situ erhalten wurde. Noch eine weitere Kurve zeigt dieselbe Messung korrigiert um die überlagernden Hintergrundreaktionen (siehe Beispiel 2).

Erwartungsgemäß zeigt die korrigierte Kurve einen sigmoiden Verlauf, was den stetigen Anstieg der Ribozymkonzentration im Laufe der Transkriptionsreaktion reflektiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, die Ribozyme als Reporter zur Messung von Transkriptionsraten in vitro und in vivo einzusetzen. Ein derartiges Reporter-System kann beispielsweise zum Hochdurchsatz-Screening von kombinatorischen Substanzbibliotheken auf Inhibitoren von Transkriptionsfaktoren verwendet werden, da es

vollautomatisiert eingesetzt werden kann und ohne zusätzliche Pipettierschritte auskommt.

Den oben beschriebenen RNA-Oligonucleotidsubstraten analoge DNA-Oligonucleotide sind kommerziell erhältlich (z.B. von PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) oder durch einfache Synthese zugänglich (Livak et al., PCR Methods Appl. 4 (1995) 1-6 und Rudert et al., BioTechniques 22 (1997) 1140-1145). Beispielsweise werden die doppelt markierten DNA-Oligonucleotide zur semiquantitativen Analyse von PCR-amplifizierter DNA eingesetzt (Taqman®, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; siehe auch z.B. Lang et al., J. Immun. Methods 203 (1997), 181-192). Die Taqman®-PCR-Technik nutzt dabei die intrinsische 5' -> 3' Nuclease-Aktivität des Taq-Polymerase-Enzyms: Während der Amplifikation wird das 5'- und 3'- doppelt markierte DNA-Oligonucleotid vom Enzym hydrolysiert. Nach Spaltung der DNA-Sonde diffundieren Fluorophor und Quencher auseinander, was die Aufhebung der Fluoreszenz-Löschung zur Folge hat. Die Fluoreszenz des Fluorophors wird anschließend gemessen und dient als Maß für die erzielte Amplifikation (Livak et al., Research News (1995), PA Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Ähnlich der vorstehend beschriebenen Anwendung für doppelt markierte DNA-Oligonucleotide ist auch die Verwendung von entsprechenden RNA-basierenden Substraten problemlos realisierbar. Methoden zur Markierung von Ribonucleinsäuren mit fluorophoren bzw. fluoreszenzlöschenden Gruppen sowie Techniken zur Messung des Energietransfers (Quenching) wurden bereits detailliert beschrieben (Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997), 241-251). Die synthetische und enzymatische Herstellung von Ribozymen sowie die Herstellung linearisierter Transkriptionsvektoren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt (Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997) 51-111). 5'-Fluorophor- und 3'-Quencher-markierte



RNA-Oligonucleotide sind ebenso wie die analogen DNA-Oligonucleotide kommerziell erhältlich (z. B. 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierte RNA bei Eurogentec, Belgien). Die Markierung erfolgt günstigerweise an den RNA-Enden, um die Hybridisierung des Ribozyms nicht zu beeinflussen.

Um die mit unerwünschter Spaltung (z.B. durch Nucleasen im Transkriptionssystem) einhergehende Fluoreszenz-Emission zu vermeiden, ist insbesondere der Einsatz Nuclease-resistenter Oligonucleotid-Substrate von Vorteil (Eaton und Pieken, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995), 837-863 und Shimayama et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (1993), 2605-2611). Dies ist vor allem in Hinblick auf in vivo-Anwendungen von Vorteil, bei denen das doppelt markierte Substrat durch geeignete Techniken (z.B. Mikroinjektion, Liposomentransport, etc.) exogen in Zellen eingeschleust wird (P. Turner (Hrsg.), *Ribozyme protocols*, Humana press (1997), 417-451). Somit handelt es sich in einer besonders bevorzugten Ausführungsform bei den doppelt markierten Substraten um modifizierte RNA-Oligonucleotide. Solange die Spaltstelle im Substrat NUH ↓, (nach IUB Code.: N = jede Base, H = A, U oder C) lautet, kann das Substrat Desoxyribonucleotide oder/und modifizierte Basen oder/und 2'-modifizierte Riboseeinheiten enthalten. Dadurch wird die Stabilität des Substrates im Zellextrakt erhöht (N. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 20 (1992), 4559-4565). Auch kann die Verwendung von intern-markierten, statt end-markierten Oligonucleotid-Substraten zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis beitragen, da die Fluoreszenzlöschung u. a. mit kürzeren Abständen zwischen den beiden Gruppen (Fluorophor und Quencher) verstärkt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Transkriptionsraten, die folgenden Schritte umfassend:

- (a) Inkontaktbringen der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung mit einem in vitro-Transkriptionssystem unter Bedingungen, bei denen die Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz erfolgt und bei denen das Ribozym katalytisch aktiv ist; und
- (b) Messung der Menge an gespaltenem Oligonucleotidsubstrat nach einem und/oder über einen geeigneten Zeitraum.

Nachfolgend ist die prinzipielle Vorgehensweise erläutert, um die Erfindung als einfache Screening-Methode zur Identifizierung von Transkriptionseinhibitoren aus kombinatorischen Substanzbibliotheken zu nutzen.

- (a) Auswahl und Herstellung der Ribozym-codierenden DNA und des doppelt markierten Oligonucleotid-Substrates.

Ribozym-codierende DNA-Sequenzen sind dem Fachmann bekannt. Entsprechend dem gewünschten Ribozymtyp und der passenden Oligonucleotidsubstrat-Sequenz kann die das erfindungsgemäße Ribozym codierende DNA-Sequenz gemäß dem Fachmann bekannten Techniken hergestellt werden.

Dabei dient als Matrize für die in vitro-Transkription des Ribozyms entweder doppelsträngige PCR-DNA oder ein linearisierter Vektor. Methoden zur Herstellung entsprechender Matrizen sind dem Fachmann bekannt (Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997), 69-78 und 121-139).

Besonders bevorzugt sind Hammerhead-Ribozyme. Da pH-Wert, Temperatur,  $Mg^{2+}$ -Konzentration sowie Art und Länge der Substrat-bindenden Sequenzen die Ribozym-Aktivität stark beeinflussen, gilt es, diejenige Kombination von Ribozym und Substrat auszuwählen, die zu optimierten Umsatzraten unter den physiologischen Bedingungen des jeweiligen Test-Systems führt. Geeignete Vorgehensweisen sind dem Fachmann bekannt.

Ein Hammerhead-Ribozym mit guten intermolekularen Spaltungseigenschaften bezüglich der komplexierten Substrat-RNA ( $k_{\text{cat}}/K_m = 0,032 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$  bei pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) ist beschrieben in Fedor und O. Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 1668-1672: 5'-GGG UCC UCU GAU GAG GGC CGU UAG GCC GAA ACU CC-3' (Ribozym) und 5'-GGG AGU CAG GAU-3' (Substrat). Auf Grundlage dieser Sequenzen können beispielsweise günstige Hammerhead-Ribozym-Varianten und entsprechende Substrate entworfen werden (siehe Beispiel 1).

Neben den kinetischen Parametern ist beim Design des Ribozyms vor allem darauf zu achten, daß abgesehen von der Promotorsequenz selbst der direkt auf den Promotor folgende transkribierte Bereich (von bis zu 10 Nucleotiden) oft einen entscheidenden Einfluß auf die Transkriptionsraten hat. Da die 5'-transkribierte Sequenz in der Regel identisch ist mit einem Teil des Substrat-Hybridisierungsbereiches, ist im besonderen Maße beim Entwurf der Ribozym- und Substrat-Sequenzen zu beachten, daß sowohl eine optimale Transkription als auch die Ribozym-Substrat-Hybridisierung möglich ist. Bei der Auswahl der doppelt markierten Substrat-Sequenz ist des weiteren insbesondere auf folgende Punkte zu achten:

- Die NUH-Schnittstelle lautet günstigerweise GUC oder AUC.
- Das Emissionsspektrum des Fluorophors überlappt mit dem Absorptionsspektrum des Quencher-Farbstoffes.
- Das Substrat bildet möglichst keine intramolekularen Sekundärstrukturen.
- Die 5'-terminale Base sollte nicht Guanosin sein.
- Das Substrat sollte günstigerweise symmetrisch über 12 bis höchstens 16 Nucleotide an das Ribozym hybridisieren.

## (b) Herstellung des in vitro-Transkriptions-Systems

Die Herstellung von Zellextrakten, die als in vitro-Transkriptionssysteme genutzt werden, ist dem Fachmann bekannt. Die Durchführung von in vitro-Transkriptionen in diesen Zellextrakten ist dem Fachmann ebenfalls bekannt. Ein Beispiel für ein geeignetes in vitro-Transkriptionssystem ist das Klasse II System aus menschlichen Zellkernextrakten (Matsui et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 11992-11996; und Roeder, Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 327-335). Die Aktivität von Hammerhead-Ribozymen ist in der Regel unter physiologischen Bedingungen ausreichend hoch, kann aber beispielsweise durch Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf 5 bis 10 mM gesteigert werden. In der Regel bleibt dadurch die Transkription unbeeinflusst.

## (c) Durchführung der Reaktion

Dem Zellextrakt wird eine geeignete DNA-Matrize zugesetzt, die die Transkription des gewünschten Ribozyms ermöglicht. Das Oligonucleotid-Substrat wird dem Ansatz günstigerweise im Überschuß zugesetzt, um im Meßzeitraum lineare, reproduzierbare Abhängigkeiten zwischen dem akkumulierten Reporter-Ribozym und dem gemessenen Signal (vorzugsweise einem Fluoreszenz-Signal) zu gewährleisten. Eine parallele Messung verschiedener Transkriptionsansätze kann beispielsweise in kommerziell erhältlichen "96-Well"-Mikrotiterplatten erfolgen. Nachdem die zu testenden, potentiellen Inhibitoren oder Aktivatoren zugesetzt wurden, wird die in vitro-Transkription dann, beispielsweise durch Zugabe der entsprechenden RNA-Polymerase, gestartet. Geeignete Reaktionszeiten liegen im Bereich von etwa 1 min bis etwa 60 min.

Die Messung der Transkriptionsrate erfolgt durch die Bestimmung der Fluoreszenz, die mit der Menge an gespaltenem

Oligonucleotidsubstrat gekoppelt ist. In entsprechend geeichten Systemen kann die tatsächliche Menge an transkribierter RNA bestimmt werden. Die Eichung kann beispielsweise wie folgt vorgenommen werden. Bekannte Mengen an Ribozym-codierender DNA werden mit bekannten Mengen an doppelt markiertem Substrat inkubiert. Die Transkription erfolgt dabei in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -UTP, welches in die entstehende Ribozym-RNA eingebaut wird. In identischen Ansätzen mißt man dann zeitabhängig den Anstieg der Fluoreszenz, wobei die einzelnen Ansätze zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt werden. Zur Quantifizierung der entstandenen Mengen an Ribozym werden die Ansätze auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphor-Imagers ausgewertet. Über die Einbaurate des Radionucleotids kann dann die Menge an Ribozym für jeden Meßpunkt bestimmt werden. Durch Auftrag der gemessenen relativen Fluoreszenz gegen die ermittelte Ribozymkonzentration erhält man schließlich die Eichkurve für nachfolgende Messungen.

#### (d) Messung der Transkriptionsraten und Auswertung

Bei der Verwendung von Oligonucleotidsubstraten, die mit einer fluorophoren Gruppe und einer fluoro-reszenzlöschenden Gruppe markiert sind, erfolgt die Messung der emittierten Fluoreszenz günstigerweise automatisiert mit Hilfe eines geeigneten "Read-Out"-Gerätes (z.B. ABI Prism 770 Sequence Detection System, Perkin Elmer). Methoden zur Eichung und der Fluoreszenz-Messung selbst sowie Programme zur Computer-unterstützten Datenverarbeitung sind detailliert beschrieben (Handbuch zu ABI Prism 770 Sequence Detection System, Perkin Elmer; Rudert et al., BioTechniques 22 (1997) 1140-1145). Im Prinzip wird die Fluoreszenz des Fluorophors über Hintergrund ( $\Delta R_n$ -Wert) für jeden Transkriptionsansatz zeitabhängig aufgezeichnet. Die Auswertung kann anschließend am ABI Prism 7700-Gerät selbst erfolgen, indem die Spektren der verschiedenen Ansätze bei

unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Spektrum der nicht-inhibierten Referenz verglichen werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Identifizierung von Hemmstoffen der Transkription oder Transkriptionsaktivatoren, die folgenden Schritte umfassend:

- (a) Inkontaktbringen der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung mit einem ersten in vitro-Transkriptionssystem und einem zweiten Transkriptionssystem, das die zu untersuchende Verbindung enthält, unter Bedingungen, bei denen die Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz erfolgt und bei denen das Ribozym katalytisch aktiv ist;
- (b) Messung der Menge an gespaltenem Oligonucleotidsubstrat nach einem und/oder über einen geeigneten Zeitraum in beiden Transkriptionssystemen, wobei eine höhere Transkriptionsrate im zweiten Transkriptionssystem auf die Gegenwart eines Transkriptionsaktivators hindeutet und eine erniedrigte Transkriptionsrate auf die Gegenwart eines Hemmstoffs der Transkription.

Die prinzipielle Vorgehensweise ist mit der vorstehend beschriebenen identisch, außer daß nicht nur ein Testsystem verwendet wird, sondern zwei Systeme, die sich nur in einem Punkt unterscheiden, nämlich dadurch, daß das zweite Testsystem die zu untersuchende Verbindung enthält.

Nach Auswertung der Daten kann die Auswirkung der zugesetzten Substanz auf die Transkriptionsrate relativ zur Referenz (= nicht-inhibierte Transkription) bestimmt werden: Ein geringeres Fluoreszenzsignal deutet auf Inhibition hin, ein höheres Signal auf die Gegenwart eines Transkriptionsaktivators.

Um die Nützlichkeit der vorstehend beschriebenen Ribozyme und die Sensitivität des beschriebenen Verfahrens weiter zu erhöhen, können Techniken der "in vitro-Selektion" (Pan, Curr. Op. Chem. Biol. 1 (1997), 17-25; Breaker, Chem Rev. 97 (1997), 371-390) und des "Ribozym-Engineering" (Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997) 11-15, 141-159, 253-273) angewandt werden. Damit können besonders effektive de novo-Ribozyme bzw. Varianten natürlicher Ribozyme hergestellt werden, um optimale Umsatzraten mit dem nicht-natürlichen Oligonucleotid-Substrat unter den jeweiligen Bedingungen des in vitro-Transkriptions-Systems zu erzielen (S. Santoro and G. Joyce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 4262-4266).

Diese in vitro-Selektion wurde in jüngster Zeit erfolgreich angewandt, um Ribozyme mit veränderten Substrat-Spezifitäten und Aktivitäten zu erzeugen (Vaish, Biochemistry 36 (1997), 6495-6501, und Berzal-Herranz et al., Gene Dev. 6 (1992), 129-134). Ein besonders günstiges Verfahren stellt in diesem Zusammenhang die "in trans-Selektion" von Ribozymen dar, bei der direkt auf Spaltung des doppelt markierten Oligonucleotid-Substrates selektiert wird (Ishizaka, Biochem. Biophys. Research Com. 214 (1995), 403-409). Aus den durch dieses Verfahren erhältlichen Ribozymsequenzen können unmittelbar diejenigen Ribozyme isoliert werden, die im automatisierten Fluoreszenz-Screening der Zellextrakte die gewünschte Eigenschaft zeigen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die vorstehend beschriebene Zusammensetzung, die eine DNA-Sequenz enthält, die ein in vitro-selektiertes Ribozym codiert.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung zur absoluten oder vergleichenden Messung von Transkriptionsraten, vorzugsweise mittels der vorstehend beschriebenen Verfahren.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren zur Messung der katalytischen Aktivität von Ribozymen.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich die vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen enthaltende Kits, vorzugsweise zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren. Erfindungsgemäß bevorzugt werden Kits, die ferner ein in vitro-Transkriptionssystem, beispielsweise eines der vorstehend beschriebenen Systeme enthalten.

#### Legende zu den Figuren:

##### Figur 1:

Schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung (in vitro Reporter-System). (1) Erzeugung des Ribozyms durch in vitro-Transkription im Zellextrakt. Als Matrize dient eine entsprechende DNA-Sequenz, beispielsweise vektoriellen Ursprungs. (2) Die Bindung des doppelt markierten Substrates (z.B. 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierte RNA) an das Ribozym führt zur Ausbildung des katalytisch aktiven Komplexes. Die Fluoreszenz ist im Substrat intramolekular gelöscht. (3) Spaltung des doppelt markierten Substrates. (4) Dissoziation der Reaktionsprodukte vom Ribozym. Durch Aufhebung des Quench-Effektes wird ein Fluoreszenz-Signal  $h\nu$  gemessen.

##### Figur 2:

Ermittlung der kinetischen Parameter von HHR1 [4 nM] bei 37 °C. (a) Eadie-Hofstee Auftragung und kinetische Parameter der Spaltungsaktivität von HHR1 mit 5'-<sup>32</sup>P-markiertem Substrat (S1), das keine FRET-Markierung trägt. (b) Eadie-Hofstee Auftragung und kinetische Parameter der Spaltungsaktivität von HHR1 mit dem FRET-Substrat (SL1).



Figur 3:

Charakterisierung der Spaltungsaktivität bei 4 nM HHR1 und 200 bzw. 300 nM SL1. (a) Zeitabhängiger Verlauf der Spaltung mit der reziprok exponentiellen Regressionskurve (nur 1 % aller gemessenen Datenpunkte sind abgebildet). (b-d) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit des HHR1 von (b) dem pH-Wert, (c) der Temperatur und (d) der  $Mg^{2+}$ -Konzentration. Die  $k_{cat}/K_M$ -Werte bei 25 °C ( $0.0134 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) wurden ebenfalls bestimmt.

Figur 4:

Zeitabhängiger Fluoreszenzanstieg von in situ erzeugtem HHR und Kontrollansätze in Gegenwart von HeLa-Zellextrakten. HHR1mut-DNA + T7 RNA Polymerase, HHR1-DNA ohne T7 RNA Polymerase, HHR1-DNA + T7 RNA Polymerase, HHR1-DNA + T7 RNA Polymerase korrigiert um die unspezifischen Hintergrundaktivitäten (s. Beispiel 2).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1**

**Messung des Einflusses von Inhibitoren auf die in vitro-  
Transkription mit T7-RNA-Polymerase**

1. Herstellung der Ribozym-codierenden Matrizen-DNA und der 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierten Substrat-RNA

Die in diesem Beispiel beschriebene Ribozym-codierende DNA Sequenz HHR1-DNA sowie das RNA-Substrat SL1 sind abgeleitet von einem bekannten Hammerheadribozym-Substrat-Komplex (M. Fedor und O. Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 1668-1672). Die Matrize für die in vitro-Transkription des Ribozyms HHR1, die Ribozym-codierende doppelsträngige HHR1-DNA, wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erzeugt. Zu diesem Zweck wurde der Sense-Strang des Ribozyms, inklusive

5'-terminaler T7-Promotor-Sequenz, an einem "Expedite Oligonucleotide Synthesizer" (Millipore, USA) synthetisiert: 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT A GGG TCC TCT GAT GAG GCC GTT AGG CCG AAA CTC GT-3' (HHR1-DNA; die Primerbindestellen sind kursiv geschrieben). Die Synthese des Antisense-Stranges sowie die Amplifikation der doppelsträngigen Matrize erfolgte unter Verwendung folgender Primer: 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT A-3' (5'-Primer) und 3'-GG CAA TCC GGC TTT GAG CA-5' (3'-Primer). Ein typischer 100 µl-Reaktionsansatz enthielt: 10 mM Tris-HCl, pH 8,9, 100 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mg/ml Rinderserumalbumin, 0,05 % Tween 20 (v/v), 200 µM dA/dC/dG/dTTP, 2 µM 5'- und 3'-Primer, ca. 200 nM einzelsträngige DNA-Matrize und 2,5 Einheiten Tth-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte nach Herstellerprotokoll (Boehringer Mannheim, Tth-DNA-Polymerase Kit) in vier bis fünf PCR-Zyklen à 95 °C, 55 Sec.; 55 °C, 1 Min.; 72 °C, 1 Minute. Die amplifizierte DNA wurde anschließend nach Standardmethoden isoliert und über ein Agarosegel von überschüssigen Primern gereinigt (T. Maniatis, E. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1982), 14.2-14.35). In analoger Weise wurde eine doppelsträngige DNA-Matrize, codierend für eine inaktive Ribozym-Variante HHR1mut, ausgehend von folgender einzelsträngiger DNA hergestellt: 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT A GGG TCC TCT TAG GAG GCC GTT AGG CCA GAA CTC GT-3' (HHR1mut; Primer-Bindestellen sind kursiv geschrieben, Mutationen hervorgehoben). Die folgenden Primer 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT A-3' (5'-Primer) und 3'-GG CAA TCC GGT CTT GAG CA-5' (3'-Primer) wurden verwendet.

Die 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierte Substrat-RNA SL1 mit der Sequenz 5'-FAM-ACG AGU CAG GAU U-TAMRA-3' wurde bei Eurogentec (Belgien) bezogen und über ein 20%iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt (P. Turner (Hrsg.), Ribozyme protocols, Humana press (1997) 79-81).

## 2. In vitro-Transkription

Ein typischer 50  $\mu$ l Reaktionsansatz enthielt: 40 mM TrisHCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM Spermidin, 5 mM Dithiothreitol, 5 - 25 mM  $MgCl_2$ , ca. 500 nM SL1, 0.2 - 2  $\mu$ M HHR1-DNA bzw. HHR1mut-DNA, 4 mM A/C/G/UTP und 50 Einheiten T7-RNA-Polymerase. Es ist wichtig darauf zu achten, daß in die Transkription ausschließlich doppelsträngige DNA eingesetzt wird, da sowohl einzelsträngige Sense-Strang-DNA, als auch 3'-Primer-DNA die Spaltungs-Reaktion inhibieren könnten. Die in vitro-Transkription wurde durch Zugabe der Polymerase gestartet und es wurde bei 37°C für die Dauer der Messung inkubiert.

## 3. Echt-Zeit-Messung der Fluoreszenz bei Spaltung von SL1 durch HHR1:

Die Fluoreszenzmessung der Transkriptionsansätze erfolgte automatisiert in einem temperierbaren "ABI Prism 770"-Spektrometer (Applied Biosystems, USA). In Abständen von 7 Sekunden wurden Spektren im Emissions-Wellenlängenbereich der beiden Farbstoffe (FAM,  $\lambda_{max}$  = 518 nm und TAMRA,  $\lambda_{max}$  = 582 nm) aufgezeichnet (Anregungsenergie = 488 nm). Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden die gesammelten Daten mit Hilfe der Geräte-eigenen Software ausgewertet. Zur Echt-Zeit-Verlaufskontrolle der einzelnen Transkriptionen wurden die Fluoreszenzspektren (Bereich von 500 nm bis 660 nm) zeitabhängig über das Spektrum der Referenz-Transkription (mit nicht-funktionaler HHR1mut-DNA) projiziert. Bei optimalen Transkriptionsbedingungen konnte dabei ein deutlicher Anstieg der FAM-spezifischen Fluoreszenz in Ansätzen mit HHR1-DNA relativ zur konstanten Fluoreszenz der Referenz-Transkription mit HHR1mut-DNA beobachtet werden. Durch Auftrag der relativen Fluoreszenz des Fluorophors ( $\Delta R_n$ -Wert) bei 535 nm gegen die Zeit wurde anschließend der Anteil an gespaltener Substrat-RNA relativ zur Negativkontrolle (identischer Ansatz mit inaktiver

HHRlmut-DNA anstatt HHRl-DNA) bestimmt. Methoden zur Eichung des Geräts sowie Programme zur Computer-unterstützten Datenverarbeitung sind detailliert beschrieben (Handbuch zu ABI Prism 770 Sequence Detection System, Perkin Elmer; W. Rudert et al., BioTechniques 22 (1997) 1140-1145). Die Auswertung der Meßdaten für eine Substratkonzentration von 900 nM SL1 ergab erwartungsgemäß, daß die relative Fluoreszenz  $\Delta R_n$  des Fluorophors bei konstanter Konzentration an HHRl-DNA mit den Inkubationszeiten anstieg. Das inaktivierte Ribozym HHRlmut hatte keinen Einfluß auf das gemessene Fluoreszenzsignal.

#### 4. Echt-Zeit-Messung der T7-Transkriptionsraten in Gegenwart von Inhibitoren der T7-RNA-Polymerase:

Die Messungen wurden wie unter 3. in analoger Weise durchgeführt, diesmal mit T7-Lysozym, einem Inhibitor der T7-RNAPolymerase (R. Ikeda, P. Bailey, J. Biol. Chem. 267 (1992), 20153-20159). Erwartungsgemäß nahm  $\Delta R_n$  relativ zur nicht-inhibierten Transkription mit steigender Inhibitor-Konzentration ab.

### Beispiel 2

#### Aktivitätsbestimmung von in situ erzeugten Ribozymen in Gegenwart von Zellkernextrakten

##### 1. Herstellung der Substrat-RNA

Die Herstellung erfolgt wie in Beispiel 1.1 beschrieben.

##### 2. Messung der Ribozymaktivität

Ein typischer 50 µl Reaktionsansatz zur in vitro Transkription für die Ribozym-Herstellung enthielt: 40 mM Tris-HCl, pH 8,0,

50 mM NaCl, 2 mM Spermidin, 5 mM Dithiothreitol, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 - 2 µM HHR1-DNA bzw. HHR1mut-DNA, 4 mM A/C/G/UTP, 40 Einheiten RNAsin (Promega, Madison, WI) und 50 Einheiten T7 RNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg). Die RNA wurde über ein 16 % denaturierendes Polyacrylamidgel (37.5:1) aufgereinigt. Zur Messung der Ribozymaktivität von in situ erzeugtem HHR1 enthielt der Ansatz zusätzlich 100 nM SL1 und 10 Einheiten HeLa-Kernextrakt (HeLa Cell Extract Transcription System, Promega, Madison, WI). Die in vitro Transkription wurde durch Zugabe der Polymerase und Kernextrakt gestartet und bei 37 °C für die Dauer der Messung inkubiert.

Die Echtzeit-Messungen des ribozymbedingten Fluoreszenzanstiegs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt. Das gemessene Signal beinhaltet dabei sowohl den chemischen Schritt der Spaltung, als auch die Freisetzung der Spaltprodukte. Die Fluoreszenzmessung der Transkriptionsansätze erfolgte automatisiert in einem temperierbaren ABI Prism 770 Spektrometer (Applied Biosystems, USA). In Abständen von 0.5 - 0.7 s wurden Spektren im Emissions-Wellenlängenbereich der beiden Farbstoffe (FAM,  $\lambda_{\max}$  = 535 nm und TAMRA,  $\lambda_{\max}$  = 582 nm) aufgezeichnet (Anregungsenergie = 488 nm). Alle Messungen waren Triplett-Bestimmungen. Durch Auftrag der relativen Fluoreszenz des Fluorophors ( $\Delta R_n$ -Wert) bei 535 nm gegen die Zeit wurde anschließend der Anteil an gespaltenen Substrat-RNA relativ zur Negativkontrolle (identischer Ansatz mit inaktiver HHR1mut-DNA anstatt HHR1-DNA) bestimmt. Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel importiert, bearbeitet und anschließend mit Hilfe des Programms KaleidaGraph (Abelbeck Software, München) ausgewertet.

Um unspezifische Fluoreszenzeffekte der Messung zu eliminieren, mußte berücksichtigt werden, daß bei einem

Anstieg der Fluoreszenz durch die katalytische Spaltung die absoluten Fluoreszenzschwankungen zunehmen, jedoch nicht deren prozentualen Schwankungen. Der zeitliche Verlauf der Spaltung wurde anhand der Kurve, die für die Negativkontrollen gemessen wurde, und deren prozentualer zeitlicher Abweichung vom Anfangswert entsprechend der Gleichung (1)

$$F_{korr}(t) = \frac{F_{neg}(t)}{F_{neg}(t_0)} \times F_{HHR}(t) \quad (1)$$

korrigiert. [ $F_{korr}(t)$ : korrigierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$ ;  
 $F_{neg}(t)$ : Fluoreszenz der Negativkontrolle zum Zeitpunkt  $t$ ;  
 $F_{neg}(t_0)$ : Fluoreszenz der Negativkontrolle zum Zeitpunkt  $t = 0$ ;  
 $F_{HHR}(t)$ : gemessener Fluoreszenzanstieg in Gegenwart von transkribiertem HHR zum Zeitpunkt  $t$ ].

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Zusammensetzung, enthaltend
  - (a) eine ein Ribozym codierende DNA-Sequenz, die mit einem Promotor und/oder regulatorischen Elementen funktionell verknüpft ist; und
  - (b) ein Oligonucleotidsubstrat, das von dem von der DNA aus (a) transkribierten Ribozym gespalten wird, wobei das gespaltene Oligonucleotidsubstrat von dem ungespaltenen Oligonucleotidsubstrat unterscheidbar ist und ein unmittelbar meßbares Signal erzeugt wird.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz ein Hammerhead-Ribozym codiert.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz (a) in einen Vektor insertiert ist.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die DNA-Sequenz (a) und/oder das Oligonucleotidsubstrat (b) Nuclease-resistent sind.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Oligonucleotidsubstrat ein doppelt markiertes Oligonucleotidsubstrat ist.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei das doppelt markierte Oligonucleotidsubstrat eine fluorophore Gruppe und eine fluoreszenzlöschende Gruppe enthält und wobei nach Spaltung mit dem Ribozym die Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors durch die fluoreszenzlöschende Gruppe unterbunden ist.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die fluorophore Gruppe 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und die

fluoreszenzlöschende Gruppe 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) ist.

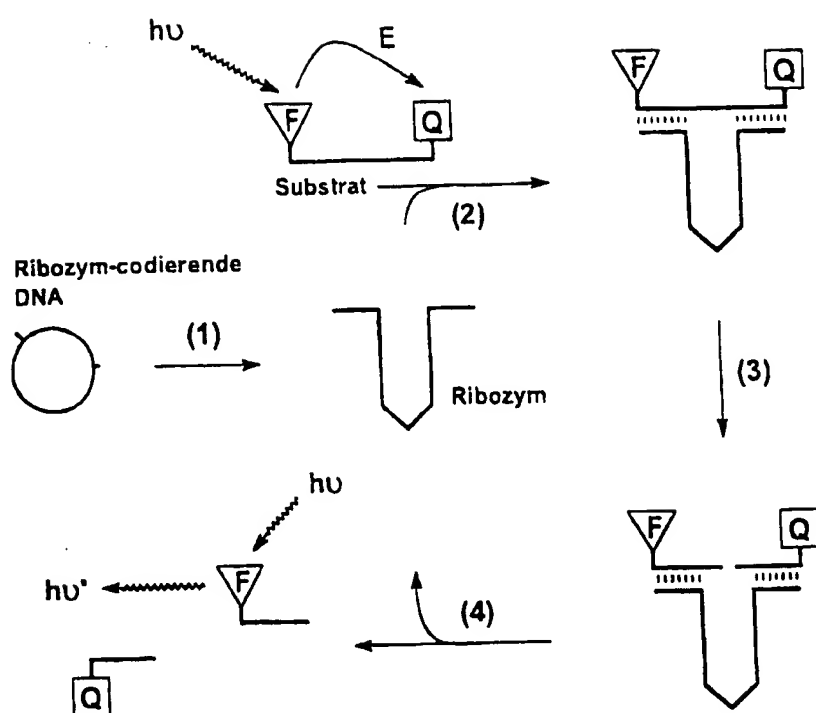
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz von (a) ein in vitro-selektiertes oder nicht-natürliches Ribozym codiert.
9. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Transkriptionsraten, die folgenden Schritte umfassend:
  - (a) Inkontaktbringen der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einem in vitro-Transkriptionssystem unter Bedingungen, bei denen die Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz erfolgt und bei denen das Ribozym katalytisch aktiv ist; und
  - (b) Messung der Menge an gespaltenem Oligonucleotidsubstrat nach einem und/oder über einen geeigneten Zeitraum.
10. Verfahren zur Identifizierung von Hemmstoffen der Transkription oder Transkriptionsaktivatoren, die folgenden Schritte umfassend:
  - (a) Inkontaktbringen der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einem ersten in vitro-Transkriptionssystem und einem zweiten Transkriptionssystem, das die zu untersuchende Verbindung enthält, unter Bedingungen, bei denen die Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz erfolgt und bei denen das Ribozym katalytisch aktiv ist; und
  - (b) Messung der Menge an gespaltenem Oligonucleotidsubstrat nach einem und/oder über einen geeigneten Zeitraum in beiden Transkriptionssystemen, wobei eine höhere Transkriptionsrate im zweiten Transkriptionssystem im Vergleich zum ersten Transkriptionssystem auf die Gegenwart eines Transkriptionsaktivators hindeutet und



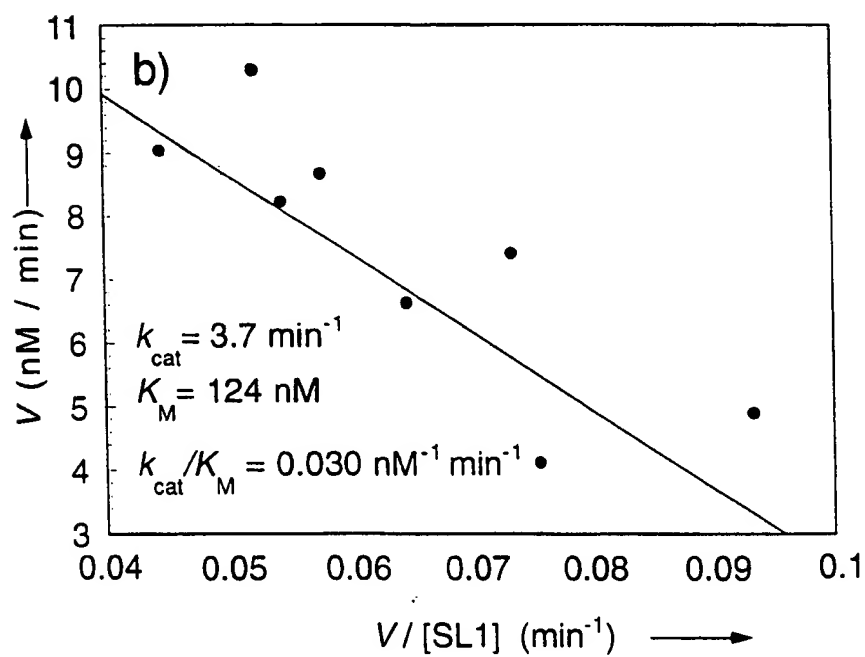
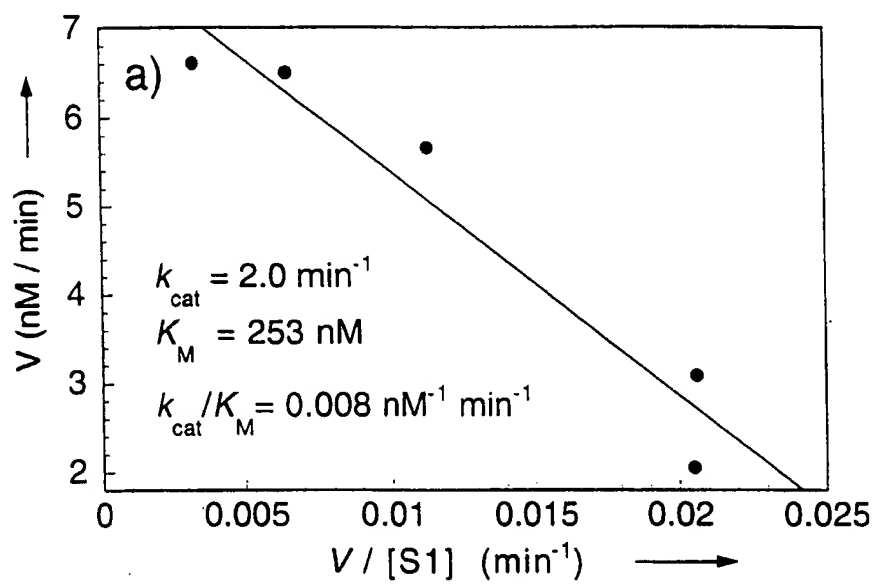
eine erniedrigte Transkriptionsrate auf die Gegenwart eines Hemmstoffs der Transkription.

11. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 9 oder 10 zur Messung der katalytischen Aktivität von Ribozymen.
12. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur absoluten oder vergleichenden Messung von Transkriptionsraten.
13. Kit, die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 enthaltend.
14. Kit nach Anspruch 13, außerdem ein in vitro-Transkriptionssystem enthaltend.

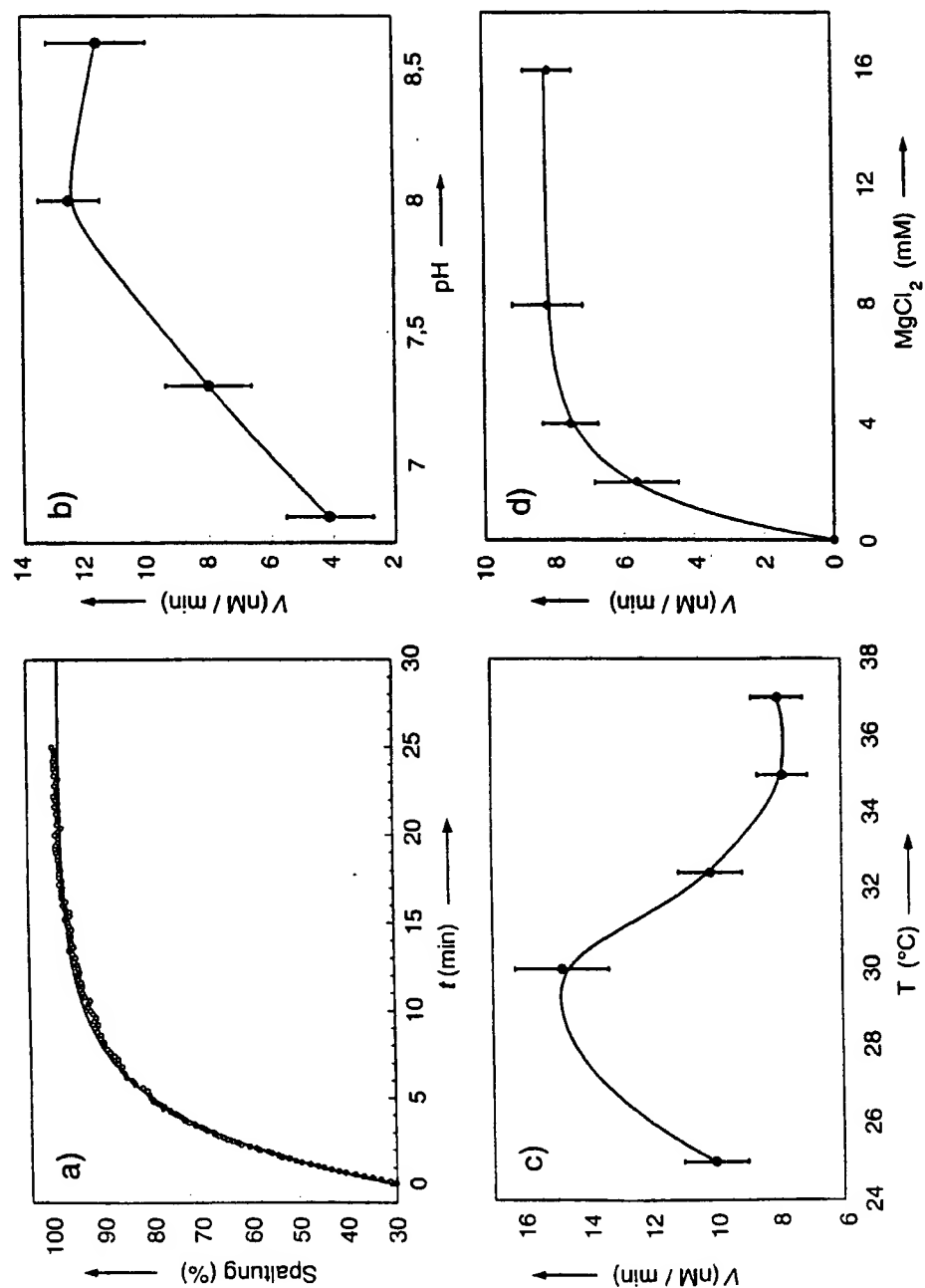
Figur 1:



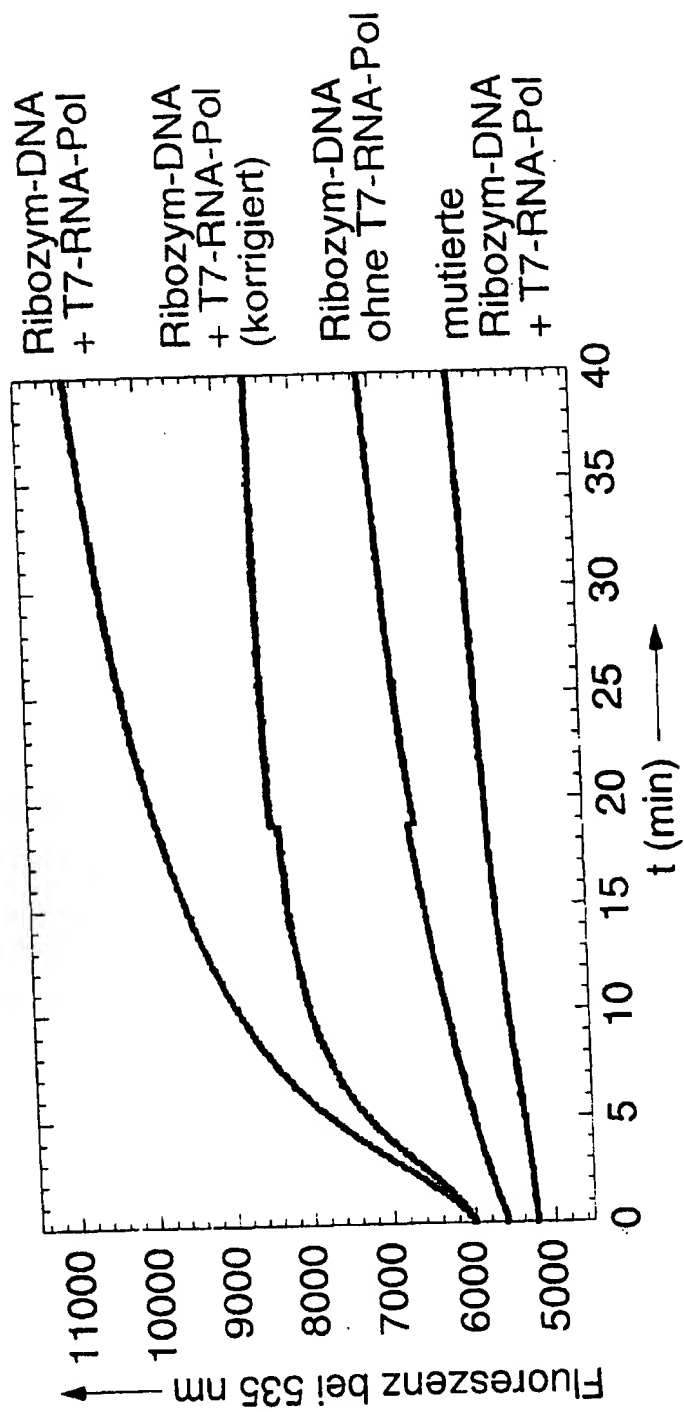
Figur 2:



Figur 3:



Figur 4:



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/01776

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 6 C12Q1/68 C12Q1/44 C12N9/00   |   |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 6 C12Q C12N  |   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)   |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |   |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | DATABASE WPI<br>Section Ch, Week 9642<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class B04, AN 96-419828<br>XP002111692<br>& JP 08 205897 A (NIKON CORP),<br>13 August 1996 (1996-08-13)<br>abstract<br><div style="text-align: center; margin-top: 20px;">             ---<br/>             -/---           </div> | 1,13  |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>  |   |   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div> |   |   |
| Date of the actual completion of the international search<br><br><div style="text-align: center;">17 August 1999</div>   |   | Date of mailing of the international search report<br><br><div style="text-align: center;">25 August 1999</div> |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><br><div style="text-align: center;">De Kok, A</div>                                      |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No  
PCT/EP 99/01776

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| O,X        | HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time"<br>ORAL PRESENTATION,<br>September 1997 (1997-09),<br>ULM DE   | 1-6,8,<br>11,13       |
| P,X        | & HANNE A ET AL.: NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES,<br>vol. 17, no. 9-11, 1998, pages 1835-1850,<br>XP002111690<br>NEW YORK US<br>page 1842 - page 1850<br>---   | 1-6,8,<br>11,13       |
| X          | WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOCHINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN)<br>6 September 1996 (1996-09-06)<br>page 13, line 5 - page 16, line 20<br>page 22, line 12 - line 25<br>page 38, line 6 - page 40, line 18            | 1-6,8,<br>11,13       |
| Y          | page Y<br>---   | 9,10                  |
| Y          | EP 0 336 626 A (LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11 October 1989 (1989-10-11)<br>page 2, line 50 - page 3, line 23<br>page 2, line 35 - line 45<br>---  | 9,10                  |
| A          | EP 0 731 178 A (HAMAMATSU PHOTONICS KK)<br>11 September 1996 (1996-09-11)<br>the whole document<br>---  | 1,5,6,13              |
| A          | HEID C A ET AL: "REAL TIME QUANTITATIVE PCR"<br>GENOME RESEARCH,<br>vol. 6, no. 10,<br>1 October 1996 (1996-10-01), pages<br>986-994, XP000642795<br>ISSN: 1088-9051<br>page 987<br>---   | 1,5-7                 |
| T          | JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)"<br>ANGEWANDTE CHEMIE,<br>vol. 38, no. 9, 3 May 1999 (1999-05-03),<br>pages 1300-1303, XP002111691<br>BERLIN DE<br>abstract<br>----- | 1-14                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No  
PCT/EP 99/01776

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| JP 8205897                                | A | 13-08-1996          | NONE                       |                     |
| -----                                     |   |                     |                            |                     |
| WO 9627026                                | A | 06-09-1996          | IL 112799 A                | 12-03-1999          |
|   |   |                     | AU 697317 B                | 01-10-1998          |
|   |   |                     | AU 5416596 A               | 18-09-1996          |
|   |   |                     | BR 9607267 A               | 15-12-1998          |
|   |   |                     | CA 2213622 A               | 06-09-1996          |
|   |   |                     | CN 1183812 A               | 03-06-1998          |
|   |   |                     | EP 0822992 A               | 11-02-1998          |
|   |   |                     | JP 11500917 T              | 26-01-1999          |
| -----                                     |   |                     |                            |                     |
| EP 0336626                                | A | 11-10-1989          | US 5070012 A               | 03-12-1991          |
|   |   |                     | JP 2031700 A               | 01-02-1990          |
| -----                                     |   |                     |                            |                     |
| EP 0731178                                | A | 11-09-1996          | JP 8313529 A               | 29-11-1996          |
|   |   |                     | US 5843658 A               | 01-12-1998          |
| -----                                     |   |                     |                            |                     |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1, LP 99/01776

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/68 C12Q1/44 C12N9/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | <p>DATABASE WPI<br/>Section Ch, Week 9642<br/>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br/>Class B04, AN 96-419828<br/>XP002111692<br/>&amp; JP 08 205897 A (NIKON CORP),<br/>13. August 1996 (1996-08-13)<br/>Zusammenfassung</p> <p>---</p> <p>-/-</p> | 1,13               |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. August 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25. AUG 1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PC1, EP 99/01776

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| O,X       | HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time"<br>ORAL PRESENTATION,<br>September 1997 (1997-09),<br>ULM DE   | 1-6,8,<br>11,13    |
| P,X       | & HANNE A ET AL.: NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES,<br>Bd. 17, Nr. 9-11, 1998, Seiten 1835-1850,<br>XP002111690<br>NEW YORK US<br>Seite 1842 - Seite 1850<br>---   | 1-6,8,<br>11,13    |
| X         | WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKCHINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN)<br>6. September 1996 (1996-09-06)<br>Seite 13, Zeile 5 - Seite 16, Zeile 20<br>Seite 22, Zeile 12 - Zeile 25<br>Seite 38, Zeile 6 - Seite 40, Zeile 18<br>Seite Y<br>--- | 1-6,8,<br>11,13    |
| Y         | ---   | 9,10               |
| Y         | EP 0 336 626 A (LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11. Oktober 1989 (1989-10-11)<br>Seite 2, Zeile 50 - Seite 3, Zeile 23<br>Seite 2, Zeile 35 - Zeile 45<br>---  | 9,10               |
| A         | EP 0 731 178 A (HAMAMATSU PHOTONICS KK)<br>11. September 1996 (1996-09-11)<br>das ganze Dokument<br>---   | 1,5,6,13           |
| A         | HEID C A ET AL: "REAL TIME QUANTITATIVE PCR"<br>GENOME RESEARCH,<br>Bd. 6, Nr. 10,<br>1. Oktober 1996 (1996-10-01), Seiten<br>986-994, XP000642795<br>ISSN: 1088-9051<br>Seite 987<br>---   | 1,5-7              |
| T         | JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)"<br>ANGEWANDTE CHEMIE,<br>Bd. 38, Nr. 9, 3. Mai 1999 (1999-05-03),<br>Seiten 1300-1303, XP002111691<br>BERLIN DE<br>Zusammenfassung<br>-----           | 1-14               |

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**  
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/01776

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| JP 8205897 A                                       | 13-08-1996                    | KEINE                             |                               |
| WO 9627026 A                                       | 06-09-1996                    | IL 112799 A                       | 12-03-1999                    |
|  |                               | AU 697317 B                       | 01-10-1998                    |
|  |                               | AU 5416596 A                      | 18-09-1996                    |
|  |                               | BR 9607267 A                      | 15-12-1998                    |
|  |                               | CA 2213622 A                      | 06-09-1996                    |
|  |                               | CN 1183812 A                      | 03-06-1998                    |
|  |                               | EP 0822992 A                      | 11-02-1998                    |
|  |                               | JP 11500917 T                     | 26-01-1999                    |
| EP 0336626 A                                       | 11-10-1989                    | US 5070012 A                      | 03-12-1991                    |
|  |                               | JP 2031700 A                      | 01-02-1990                    |
| EP 0731178 A                                       | 11-09-1996                    | JP 8313529 A                      | 29-11-1996                    |
|  |                               | US 5843658 A                      | 01-12-1998                    |